UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

EDUARDO BERTOLI BELAI

**Modulação da resposta imune durante o desenvolvimento de carcinoma
espinocelular**

BAURU

2011

EDUARDO BERTOLI BELAI

**Modulação da resposta imune durante o desenvolvimento de carcinoma
espinocelular**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

BAURU

2011

Bertoli Belai, Eduardo

B 41m Modulação da resposta imune durante o desenvolvimento
de carcinoma espinocelular / Eduardo Bertoli Belai. – Bauru,
2011.

105 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total
ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios
eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 002/2009

Data: 05 de fevereiro de 2009

EDUARDO BERTOLI BELAI

Dados Curriculares

21/02/1985	Nascimento
Filiação	José Eulice Belai Célia Regina Bertoli Belai
2003 - 2007	Graduação em Ciências - Biológicas na Universidade do Sagrado Coração - Bauru/SP
2008 - 2009	Especialização em Microbiologia Clínica na Faculdades Integradas de Bauru - Bauru/SP
2009 - Atual	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de Concentração Biologia Oral na Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo - Bauru/SP

Dedico esta dissertação à minha filha, **Maria Eduarda Vianna Belai**, que apesar de bebê e termos convivido muito pouco ainda, me ensina a cada dia o valor da vida e do amor que existe entre pai e filho.

À minha mãe **Célia Regina Bertoli Belai**, que me educa até hoje com sua forma atenciosa e prestativa. Além de me ensinar o valor que existe em cada um de nós, sempre se demonstrando muito carinhosa, amorosa e feliz.

Ao meu pai **José Eulice Belai (in memorian)**, que o tempo que ficou entre nós, ensinou a humildade, o caráter e os melhores valores da vida de um homem trabalhador que fazia de tudo pelo bem da família. *Saudades eternas meu pai...*

A meu sobrinho **Felipe Fernandes Belai (in memorian)**, pela sua alegria de viver. Tão pouco ficou entre nós, mas os bons momentos em que convivemos não saem dos meus pensamentos. *Saudades eternas meu sobrinho querido...*

À **Profa. Dra. Ana Paula Campanelli**, pelas experiências e conhecimentos transmitidos, pelo exemplo de dedicação à carreira e à profissão, pelo rigor científico com que conduz seus trabalhos, e pela paciência e compreensão devotadas a mim em momentos difíceis.

Aos Professores, **Prof. Dr. João Santana da Silva**, **Prof. Dr. Sérgio Aparecido Torres**, **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do laboratório de Farmacologia, **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, **Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria** e **Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves**, pelo incentivo durante estes anos.

Aos professores do laboratório de Histologia, **Profa. Dra. Camila de Oliveira Rodini Pegoraro**, **Prof. Dr. Rumio Taga** e **Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis**, pela amizade e apoio durante este mestrado.

Ao meu irmão, **Fernando Bertoli Belai**, pela amizade e bom exemplo a ser seguido.

Aos meus sobrinhos, **Maria Fernanda Fernandes Belai** e **Guilherme Fernandes Belai**, pela alegria quando estamos juntos.

À minha esposa, **Ligia Siscar Vianna Belai**, pela paciência e companheirismo em todos os anos de duração deste mestrado. Agradeço ao incentivo e aos bons conselhos que fizeram parte da realização deste trabalho.

Aos meus cunhados, **Priscila Fernandes Belai** e **Luíz Otávio Barbosa Vianna Filho**, que fazem parte da minha vida nos bons e maus momentos.

Aos meus sogros, **Rosimeire Siscar Vianna** e **Luíz Otávio Barbosa Vianna**, por me acolherem como filho e fazerem parte da realização deste trabalho.

Ao meu amigo **Diogo Teruo Hashimoto**, pelo seu apoio nos momentos difíceis encontrados durante a realização deste trabalho e, principalmente pela sua amizade de muitos anos.

Ao meu amigo **Rodrigo Nálío Ramos**, que contribui com seu apoio e ensinamentos desde o início deste mestrado.

Ao meu amigo **Lucas Justiniano Bermejo**, pelos anos convívios juntos neste mestrado, sempre me apoiando nos momentos difíceis e participando nos momentos felizes.

Aos meus colegas do laboratório de Microbiologia e Imunologia, **Cláudia, Hayana** e especialmente à **Thaís** e **Carine**, por com partilharem ensinamentos e colaborar diretamente na execução da pesquisa, fazendo parte da realização deste trabalho.

Aos funcionários e colegas da microbiologia, **Dalva, André** e **Livia** por sempre mostrarem dispostos e atenciosos, me ajudando a superar os momentos difíceis com bons conselhos e alegria.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacologia, **Carla, Carol, Tiago, Daniel, Karin, Bella** e **Vera**, pela boa convivência durante estes anos.

Aos meus colegas do laboratório de Histologia, **Élcia, Graciela, Cadu, Tânia, Ricardo, Brunão, Dani, Patrícia, Valério** e **Andréia**, pelos momentos felizes que vocês me proporcionaram que jamais serão esquecidos.

Aos meus colegas do laboratório de Anatomia, **Geraldo, Daniel** e **Letícia**, pela amizade desde a época de graduação.

Aos meus colegas do laboratório de Bioquímica, **Ovídio, Telma, Luís, Livia, Bruna** e **Heloísa**, por estarem sempre presentes durante todo o mestrado.

Aos colegas do biotério do Instituto Lauro de Souza Lima, **Silvia, Cláudia, Mara** e **Luís**, por estarem sempre dispostos a ajudar, concedendo sempre que possível camundongos que foram utilizados na parte experimental desta dissertação.

Aos colegas do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Luiz, Erasmo, Richard** e **Elias**, pelos anos de convivência e pelos prestativos serviços.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio e concessão de recursos tão importantes para a concretização deste Projeto (Proc. 2008/10999-7 e Proc. 2009/03471-9).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Departamento de Ciências
Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

Apoio: FAPESP

Modulação da resposta imune no local do tumor é um mecanismo crítico envolvido com evasão dos tumores. Sinais de PD-1 e PD-L1/PD-L2 podem estar envolvidos com o escape tumoral. Entretanto, pouco se sabe a respeito destas moléculas no desenvolvimento de carcinoma de células escamosas. No presente estudo, nós investigamos a expressão de PD-1 sobre células T das lesões e linfonodos de carcinomas de células escamosas. A carcinogênese de pele foi induzida quimicamente com DMBA/PMA em camundongos. A caracterização da expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 na lesão e linfonodos foram analisados por citometria de fluxo. A produção IL-10, IL-12, TGF- β e IFN- γ foi determinada por ELISA. Camundongos tratados com DMBA/PMA apresentaram maior taxa de papilomas e progressão para carcinoma de células escamosas. Nós encontramos também que células T CD4⁺PD-1⁺ migraram para o local do tumor e que maior nível de CD4⁺PD-1⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD14⁺PD-1⁺ e CD4⁺PD-L1⁺ foram detectados nos linfonodos quando comparados com o grupo controle. Além disso, as produções de IL-12, IFN- γ e TGF- β , mas não IL-10, foram altamente detectadas nas lesões comparada com do grupo controle. Estes dados indicam que a expressão de PD-1 está regulada positivamente sobre linfócitos infiltrados nos tumores e linfonodos. Este fato e os altos níveis de TGF- β e IL-10 podem contribuir para supressão da resposta imune antitumor.

Palavra chave: carcinoma espinocelular; células T; PD-1; resposta inflamatória.

Modulation of immune response during the development of squamous cell carcinoma

Modulation of immune response in tumor site is a critical mechanism involved with tumor evasion. PD-1 and PD-L1/PD-L2 signals could be involved in tumor escape. However, little is known about the role of these molecules in squamous cell carcinoma development. In the present study, we investigated the expression of PD-1 on T cells from squamous cell carcinoma lesions and lymph nodes. Skin carcinogenesis was chemically induced with DMBA/PMA in mice. Characterization of PD-1, PD-L1 and PD-L2 expression in the lesion and lymph nodes were analysed by flow cytometry. IL-10, IL-12, TGF- β and IFN- γ production was determined by ELISA. DMBA/PMA-treated mice showed higher rate of papillomas and progression to squamous cell carcinoma. We also found that CD4⁺PD-1⁺ T cells migrated to the tumor site and that higher level of CD4⁺PD-1⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD14⁺PD-1⁺ and CD4⁺PD-L1⁺ were detected in the lymph nodes when compared with the control group. Besides, IL-12, IFN- γ and TGF- β , but not IL-10, productions were higher detected in the lesions compared with the control group. These data indicate that PD-1 expression is up-regulated on tumor infiltrating lymphocytes and lymph nodes. This fact and high levels of TGF- β and IL-10 may contribute to suppression of anti-tumor immune response.

Keywords: inflammatory response; PD-1; squamous cell carcinoma; T cells.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígeno (“antigen presenting cell”)
CD	Agrupamento de diferenciação (“cluster of differentiation”)
CLA	Antígeno linfocitário cutâneo (“cutaneous lymphocyte antigen”)
CTLA	Antígeno de linfócitos T citotóxicos (“citotoxic T lymphocyte antigen”)
DC	Célula dendrítica (Dendritic cell)
DMBA	7,12-dimethylbenz[α]anthracene
HLA	Antígeno leucocitário humano (“human leucocyte antigen”)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LAG	Gene de ativação linfocitária (“lymphocyte-activation gene”)
MCA	3-methylcholanthrene
MDSCs	Células supressoras de origem mielóide (“myeloid-derived suppressor cells”)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (“major histocompatibility complex”)
MyD88	Molécula adaptadora do fator 88 de diferenciação mielóide (“myeloid differentiation primary response gene”)
PAH	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (“polycyclic aromatic hydrocarbons”)
PD	Receptor do programador de morte celular (“programmed cell death receptor”)
PD-L	Ligante para o receptor do programador de morte celular (“programmed death ligand”)

PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
RAG	Genes de ativação da recombinação ("recombination activating genes")
STAT	Sinal de transdução e ativação de transcrição ("signal transducer and activator of transcription")
TGF	Fator de crescimento transformante ("transforming growth factor")
Th	Células T auxiliares ("T cells helper")
TIL	Linfócito infiltrado no tumor ("tumor-infiltrating lymphocyte")
TIM	Domínio de mucina e imunoglobulina em células T ("T-cell immunoglobulin and mucin domain")
TLR	Receptores semelhantes a "Toll" ("Toll like receptors")
TNF	Fator de Necrose Tumoral ("Tumor Necrosis Factor")
TPA	12-O-tetradodecanoyl-phorbol-13-acetate
Treg	Célula T reguladora ("cell T regulatory")

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	29
II. PROPOSIÇÃO.....	43
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
1. Animais.....	49
2. Carcinogênese química.....	49
3. Eutanásia e coleta de tecidos tumorais.....	49
4. Citocinas.....	50
5. Anticorpos.....	50
6. Separação de leucócitos da lesão.....	50
7. Fenotipagem.....	51
8. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para citocinas.....	51
9. Análise estatística.....	51
IV. RESULTADOS.....	53
1. Desenvolvimento e progressão de carcinoma induzido quimicamente através do uso do 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) + phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) no dorso de camundongos BALB/c.....	55
2. Análise morfológica das lesões.....	61
3. Análise fenotípica do infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral e nos linfonodos regionais de camundongos submetidos ao tratamento com DMBA + PMA.....	61
4. Análise do perfil de citocinas encontradas no microambiente tumoral em camundongos submetidos à indução carcinogênica após dezesseis semanas.....	69
V. DISCUSSÃO.....	73
VI. CONCLUSÕES.....	81
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

Cerca de 90% das lesões cancerígenas presentes na cavidade oral e faringiana são carcinomas espinocelulares (CEC), que surgem a partir de células neoplásicas originadas na camada espinhosa (BSOUL *et al*, 2005). Estas células podem migrar em direção à superfície, ou, eventualmente, ocupar toda a espessura do epitélio e, em um estado mais avançado, passar através da membrana basal e invadir o estroma (SKALA *et al*, 2005). Sob o ponto de vista da progressão tumoral, este carcinoma permanece locoregional por um longo período, sendo que metástase visceral se desenvolve apenas em estágios mais avançados da doença. Suas características principais incluem a disseminação linfática e recidiva local (TIMAR *et al*, 2005).

O processo de carcinogênese geralmente pode ser caracterizado por múltiplos estágios definidos em: iniciação, promoção e progressão, até sua manifestação constatada clinicamente. A iniciação corresponde ao passo inicial e irreversível no desenvolvimento do tumor, já que lesa de forma permanente a estrutura do DNA das células e este processo pode ser induzido quimicamente em modelos animais com a utilização do DMBA. Na fase de promoção, há o estímulo da proliferação celular (expansão clonal). As células que já tiveram contato com o carcinógeno (agente iniciador) quando em contato com os agentes promotores ou co-carcinógenos serão estimuladas a desenvolver o tumor, e a velocidade do desenvolvimento da neoplasia, lenta ou rápida, ocorre em função da interação entre células iniciadas e agentes co-carcinógenos. O estágio seguinte é a progressão, culminando com a manifestação clínica do tumor (KARIN e GRETEN, 2005; PHILIP *et al*, 2004).

Em resposta para estes processos de carcinogênese, considerados como sinais de perigo, células residentes do sistema imune inato imediatamente alerta para o restante do sistema imune pela ampla produção de citocinas (VISSER e COUSSENS, 2005). Estas citocinas produzidas durante a resposta imune aguda promovem a diferenciação e ativação de células imaturas como DCs, linfócitos B e T (SMYTH, 2004). Além das citocinas inflamatórias, a ativação de linfócitos T naíve requer o direto contato com APCs, que irão após capturar antígenos migrar para órgãos linfóides secundários onde apresentaram antígenos processados em moléculas de MHC de classe I e II para linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente. Sendo que para efetiva sensibilização de células T naíve adicional interação com moléculas co-estimulatórias se faz necessário (VISSER e COUSSENS, 2005).

Historicamente, esta atribuição do sistema imune num ambiente tumoral originou-se pelo conceito de vigilância imunológica descoberto há anos (BURNET, 1970), que evidencia a capacidade de o sistema imune prevenir a formação de tumores, eliminando as células potencialmente malignas (BURNET, 1970). Mas, ao mesmo tempo, o sistema imune seleciona ou promove variantes do tumor com reduzida imunogenicidade (ZITVOGEL *et al*, 2006), fornecendo seu desenvolvimento através de um mecanismo conhecido como escape tumoral da detecção e eliminação pela resposta imune (DUNN *et al*, 2002; KHONG e RESTIFO, 2002; SCHREIBER, 2005). Estas características são observadas pelo conceito dos 3 E's, que destaca três fases relacionadas com o surgimento de células malignas que passam por um processo de eliminação pelo sistema imune que então, seleciona variantes das células tumorais, promovendo que o tumor se expanda de maneira não controlada (DUNN *et al*, 2004).

A comprovação que suporta estas teorias veio de inúmeros estudos que demonstram a eficácia do sistema imune em períodos precoces do desenvolvimento tumoral que, em estágios tardios são condicionados a um pobre prognóstico do indivíduo e ineficácia de resposta pelo sistema imune no combate contra as células tumorais (DUNN *et al*, 2004; GALON *et al*, 2006; UPPALURI *et al*, 2008). As ferramentas utilizadas para estas descobertas mostram numa delas que, existe um desequilíbrio naqueles indivíduos que foram submetidos a transplantes, considerados mais susceptíveis ao desenvolvimento de neoplasias malignas devido à ausência de um sistema imune comprometido comparado com aqueles indivíduos em condições normais de saúde (BIRKELAND *et al*, 1995; EUVRARD *et al*, 2003). Esta constatação de que o sistema imune pode reconhecer e destruir os precursores tumorais antes que se tornem clinicamente aparentes é identificado em análises experimentais de camundongos que são deficientes em determinados componentes fundamentais para a manutenção e atividade do sistema imune inato ou adaptativo, como Rag1 e Rag2 (SMYTH *et al*, 2001; STREET *et al*, 2002), Stat1 (KAPLAN *et al*, 1998), perforinas (STREET *et al*, 2001) e IFN- γ (SHANKARAN *et al*, 2001). Em animais deficientes de Stat1, o que se observa, é uma falta de resposta eficaz contra as células tumorais devido à ausência deste fator de transcrição que regula positivamente a ativação de linfócitos T. Uma melhor demonstração é caracterizada em tumores espontâneos que para sobreviver ao sistema de supressão imunológica regula a ativação de Stat3, que por sua vez inativa

Stat1, assim conseguindo inibir a produção ou sensibilização de sinais de perigo pró-inflamatórios que ativam a resposta imune inata e adaptativa (KIM *et al*, 2007).

A importância do sistema imune nestas investigações demonstradas acima confirma a definição do termo imunoeedição dos tumores, que condiz com a participação do sistema imune na eliminação e também no escape tumoral (DUNN *et al*, 2002). Entretanto, este processo é considerado involuntário ou não participante ativo na seleção de variantes de células tumorais considerando o fato de que a resposta imune pode ser ativamente suprimida pelos tumores por um mecanismo de imunosubversão (ZITVOGEL *et al*, 2006).

Colaborando com a via extrínseca, que é de fato o sistema imune no combate às células tumorais, toda célula até torna-se transformada passa primeiramente por um processo de vigilância intrínseca (LOWE *et al*, 2004; BARTKOVA *et al*, 2005) consistindo principalmente na tentativa do reparo do DNA danificado que, devido ao insucesso no seu reparo induz a morte celular por apoptose pela ativação de p53 (GORGOULIS *et al*, 2005). Com estas tentativas, a célula estaria amparada tanto por mecanismos intrínsecos e extrínsecos numa eventual transformação maligna. Porém, as células do câncer apresentam diferenças características das células saudáveis, funcionando com mecanismos de escape específicos que garantem a sobrevivência destas células em constante proliferação e alto poder metatástico. As seis características celulares intrínsecas reconhecidas e que estão envolvidas neste mecanismo de escape das células tumorais são: 1-) autossuficiência nos sinais de crescimento pela estimulação autócrina destas células tumorais; 2-) insensibilidade para sinais anti-crescimento que inibem somente a resposta imune no ambiente tumoral; 3-) evasão da apoptose através de mecanismos que bloqueiam as vias necessárias para a morte celular e a atividade efetora das células imunes; 4-) potencial replicativo sem limites devido à perda da expressão de determinadas moléculas essenciais no controle do ciclo celular; 5-) sustentada angiogênese pela aumentada expressão de diversos fatores de crescimento que estimulam os tecidos no microambiente tumoral a sair do estado de quiescência para formação de novos vasos; 6-) invasão tecidual e metástase pelas alterações nas proteínas que estão envolvidas na integridade da arquitetura tecidual e também pela secreção de proteases que degradam a matriz extracelular (ZITVOGEL *et al*, 2006; BUI e SCHREIBER, 2007; KOEBEL *et al*, 2007; STEWART e TRINCHIERI, 2009).

Apesar destas possíveis estratégias que toda célula tumoral apresenta, outra característica importante considerada como o sétimo marcador que garante o desenvolvimento do tumor é a propriedade de evasão da resposta imune por estas células. Para tal efeito as células da resposta imune exercendo pressão seletiva no combate as células dos tumores, por exemplo, diminuem ou levam a perda da expressão de moléculas, como HLA (do inglês *Human leucocyte antigen*) de classe I e as moléculas envolvidas no transporte e processamento de antígenos que serão apresentados via MHC de classe I e II (ALGARRA *et al*, 2000; MARINCOLA *et al*, 2000; SO *et al*, 2005). No decorrer desta imunoseleção, os tumores também desenvolvem mecanismos que evitam a morte celular pela citotoxicidade dos linfócitos T CD8⁺ como através da inibição ou bloqueio da via perforina - granzima-B que agem lisando as células neoplásicas (MEDEMA *et al*, 2001). Estes exemplos citados são similares aos inúmeros fatores que participam na imunossupressão pelos tumores, que caracteristicamente suprime ativamente a resposta imunológica. E dentre esses fatores, podemos citar a participação de moléculas co-estimulatórias no desenvolvimento tumoral (SELIGER *et al*, 2008; DRIESSENS *et al*, 2009).

Não descartando a contribuição dos linfócitos infiltrados nos tumores em atacar e erradicar células tumorais, dados que estão correlacionados com um melhor prognóstico e sobrevivência (SCHUMACHER *et al*, 2001; ZHANG *et al*, 2003), existe uma conexão entre a inflamação crônica e o desenvolvimento tumoral (PHILIP *et al*, 2004; VISSER e COUSSENS, 2005; SWANN *et al*, 2008) que se apresentam atualmente como novas estratégias terapêuticas de combate a diversos tipos de câncer (MOCELLIN e NITTI, 2008). Após a comunicação entre o sistema imune inato e adaptativo num contexto inflamatório agudo qualquer interação desregulada entre estas duas partes poderá resultar em uma excessiva ativação levando a uma inflamação crônica culminando com dano tecidual (KORGANOW *et al*, 1999; JI *et al*, 2002). Estas interpretações e como o sistema imune promove ou previne o câncer precisam ser definidas de quais componentes imunes participam em cada processo e qual tipo de câncer está sendo estudado. Claramente, uma resposta imune orquestrada contra um desenvolvimento tumoral irá conter diferentes tipos de células efectoras e moléculas, assim aumentando a probabilidade que a atividade de erradicação e promoção do tumor possa coexistir. Em outras palavras, apesar de tanto citocinas pró-inflamatórias como IFNs auxiliarem a ativação de linfócitos em cooperação com outros leucócitos (SMYTH

et al, 2004), ao mesmo tempo esta ativação leva a indução mais tardia da expressão de PD-1 (SELIGER *et al*, 2008), uma molécula co-estimulatória que inibe a função dos linfócitos pela interação com seu ligante PDL-1 que também será expresso em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas através da indução de IFNs, conduzindo estes linfócitos a apoptose (RILEY, 2009). Um dos mecanismos que explicam este panorama e levam a baixa efetividade e deleção clonal destes linfócitos é exaustão destas células num processo de ativação crônica (BLANK e MACKENSEN, 2007; HA *et al*, 2008; KIM e AHMED, 2010).

Apesar dos tumores geralmente não apresentarem uma carga elevada de antígenos imunogênicos, a contínua exposição para os antígenos associados aos tumores podem levar à exaustão de células T, similar às infecções virais, induzindo estado de anergia e perda de função das células T tumor-específico (YI *et al*, 2010; KIM e AHMED, 2010). Portanto, as células T estariam incapazes de elaborar suas típicas atividades efectoras, observadas pela falta de produção de IL-2, TNF- α , IFN- γ (FULLER *et al*, 2004), perda de marcadores superfície como CD62L e CD127 (FULLER *et al*, 2005) que caracterizam efetividade por parte das células T e altos níveis de receptores inibitórios (BLACKBURN *et al*, 2009). Este quadro inflamatório em que a maioria dos tumores em desenvolvimento se encontra, leva a perda de função de células T CD4⁺ pela repetida estimulação antigênica que resulta conseqüentemente na menor capacidade efectora das células T CD8⁺ em erradicar células tumorais (KIM e AHMED, 2010).

Existem evidências de que inúmeras doenças como a hepatite, pancreatite, são condições inflamatórias associadas com o desenvolvimento de câncer nestes órgãos (SHACTER e WEITZMAN, 2002; COUSSENS e WERB, 2002). O entendimento funcional de que como a inflamação pode auxiliar no desenvolvimento é constatada também pela utilização experimental de carcinógenos químicos, como a aplicação tópica de DMBA (GIRARDI *et al*, 2003) e MCA (ENGEL *et al*, 1997) na pele de camundongos, que se referem aos eventos que iniciam os processos de carcinogênese, onde a expressão de oncogenes acompanhado de um infiltrado inflamatório é essencial para promoção neoplásica.

Em correlação a estes dados, tumores em estágios avançados se observam elevadas quantidades secretadas de IL-10 e TGF- β (KHONG e RESTIFO, 2002), que

originalmente representam o término de resposta pelas células do sistema imune, devida a uma inibição de função e indução de vias pró-apoptóticas com diminuição de expressão de moléculas anti-apoptóticas (DRANOFF, 2004; SMYTH *et al*, 2004). Este infiltrado inflamatório crônico demonstra-se diferente da inflamação aguda, com expressão constitutiva de inúmeros receptores inibitórios como PD-1 (DAY *et al*, 2006) CTLA-4 (KAUFMANN *et al*, 2007) e mais recentemente TIM-3 (GOLDEN-MASON *et al*, 2009) e LAG-3 (RICHTER *et al*, 2010) que, negativamente regulam o potencial funcional e proliferativo das células que respondiam no início do desenvolvimento tumoral (DRIESSENS *et al*, 2009).

A molécula de PD-1, semelhante a CD28 e CTLA-4, é uma glicoproteína monomérica pertencente à superfamília das imunoglobulinas. A sua expressão em células T é estritamente regulada, como CTLA-4, detectando-a em linfócitos T, linfócitos B e em monócitos ativados (ISHIDA *et al*, 1992; GREENWALD *et al*, 2005; SHARPE *et al*, 2007). PD-1 apresenta dois ligantes, PD-L1 (B7-H2) e PD-L2 (B7-DC), que possuem padrões distintos de expressão. PD-L1 pode ser expresso em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas (FREEMAN *et al*, 2000), enquanto PD-L2 se restringe aos macrófagos e células dendríticas (ISHIDA *et al*, 1992; GREENWALD *et al*, 2005; SHARPE *et al*, 2007; FREEMAN *et al*, 2000). Além disso, trabalhos têm mostrado que a ação de IFN- γ induz a expressão de PD-L1, enquanto IL-4 induz a expressão de PD-L2, sugerindo um possível papel desses ligantes na regulação da resposta Th1 e Th2 (LOKE e ALLISON, 2003).

Inicialmente, as primeiras tentativas de descobrir o papel de PD-1 na resposta imune geraram resultados controversos, no entanto, estudos mais recentes determinaram a importância dessa molécula como regulador negativo da atividade das células T. A ligação de PD-1, pelo *cross-linking* com anticorpos específicos *in vitro*, inibiu a produção de IL-2 e a proliferação de células T (CARTER *et al*, 2002). A importância de PD-1 na manutenção da homeostasia foi confirmada após a construção de animais geneticamente deficientes (PD-1^{-/-}) (NISHIMURA *et al*, 1999; NISHIMURA *et al*, 2001; OKAZAKI *et al*, 2003). Esses animais desenvolveram doença autoimune, como artrite reumatóide, glomerulonefrite e cardiopatia. Esses achados indicaram a participação de PD-1 nos mecanismos de tolerância periférica. Polimorfismos no gene que codifica a molécula de PD-1 favorecem o desenvolvimento de lúpus eritematoso

sistêmico e aumentam o risco de desenvolvimento de diabetes autoimune (NIELSEN *et al*, 2003).

Além da inibição mediada por moléculas co-estimulatórias que inibem principalmente a atividade de linfócitos T CD8+ (HASPOT *et al*, 2008), temos a participação de fatores solúveis imunossupressivos produzidos pelos tumores e células do sistema imune recrutadas no microambiente tumoral (RABINOVICH *et al*, 2007). Os perfis destas células imunossupressoras, fisiologicamente, funcionam como células que regulam e determinam a tolerância periférica de resposta pelo sistema imune (HOGQUIST *et al*, 2006; KYEWSKI e KLEIN, 2006). Em certas condições patológicas, como no caso da presença de um tumor, esta tolerância exercida por estas células imunossupressoras trabalham em pró-tumor acarretando na promoção e progressão tumoral (NISHIMURA e HONJO, 2001; OKAZAKI e HONJO, 2006; RABINOVICH *et al*, 2007; KEIR *et al*, 2008). Os fatores solúveis secretados e presentes no ambiente que se desenvolve o câncer deveria ser um local de células e citocinas com um único padrão de resposta contra as células tumorais. Porém, esta representação é mais bem detalhada e melhor entendida pelas citocinas IL-10, TGF- β , produzidas tanto por células imunossupressoras como por alguns tumores (KHONG e RESTIFO, 2002).

IL-10 pode inibir a apresentação de antígenos tumorais pelas células apresentadoras de antígenos (APC), induzindo estado de anergia em linfócitos T CD8+ (DRANOFF, 2004; ASADULLAH *et al*, 2003). Esse conceito atribuído é constatado e revertido após o bloquear ou neutralizar os receptores de IL-10 em modelos pré-clínicos (VICARI *et al*, 2002). A semelhante atividade é apresentada pelo fator de crescimento transformador β que inibe a função efetora de células T (SMYTH *et al*, 2004). Esta inibição pode também inibir a proliferação de células malignas, mas estas se tornam refratárias através de mutações no receptor de TGF- β , assim como diminuição de expressão das proteínas de sinalização envolvidas na cascata de ativação desta citocina (LI *et al*, 2006). Em contrapartida, IFN- γ e TNF- α , são secretadas por células comprometidas com a capacidade efetora do sistema imune em combate as células neoplásicas (SMYTH *et al*, 2004). A citocina IFN- γ avaliada para determinar sua específica função em um determinado modelo de tumor, foi capacitada em prevenir juntamente com a participação de linfócitos, na proteção do hospedeiro contra o desenvolvimento de sarcomas induzidos quimicamente (KAPLAN *et al*, 1998; STREET

et al, 2001). Sendo que a caracterização de processos inflamatórios no controle inicial de células cancerosas descritos é mostrada em estudo que avalia o papel protetor de TLR4 na contenção inicial do desenvolvimento de tumores cutâneos induzidos quimicamente em camundongos pelo uso de DMBA (YUSUF *et al*, 2008), assim como, também no mesmo trabalho é sugerida a participação de IFN- γ neste controle. Mas como foi descrito a pouco, outros estudos demonstram que a inflamação pode induzir ao câncer em períodos que o sistema imune participa como editor de variantes celulares potencialmente malignas. Destes estudos, os autores mostraram num deles a participação de MyD88 (molécula adaptadora do fator 88 de diferenciação mielóide) que sinaliza intracelularmente os estímulos de TLRs e dos receptores para citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-18, os efeitos contraditórios do sistema imune como coadjuvante da evolução tumoral em estágios tardios do desenvolvimento em modelos de carcinogênese química em camundongos pelo uso de DMBA (induzindo carcinomas espinocelulares) e MCA (que induz fibrossarcoma) (SWANN *et al*, 2008). O fator necrose tumoral α (TNF- α), outra importante citocina no ambiente tumoral, demonstra sistemicamente a funcional capacidade de induzir apoptose em células tumorais (DRANOFF, 2004), mas ao mesmo tempo, apresenta efeitos opostos quando presente num contexto de inflamação crônica, favorecendo o desenvolvimento de tumores de pele, como no modelo aplicado neste estudo, utilizando de DMBA+TPA (MOORE *et al*, 1999).

Recentemente, apesar de estes inúmeros mecanismos demonstrarem participação no escape tumoral, a restauração de um sistema imune eficaz participando na contenção de células tumorais são demonstradas com o bloqueio de PD-1 em análises de amostras de melanoma que, diretamente influencia células T efetoras e células T reguladoras, aumentando a frequência de células T funcionais tumor-específico, mas também inativando ou suportando os efeitos inibitórios de populações de células T reguladoras (WANG *et al*, 2009). Estas células T reguladoras CD4⁺CD25^{High} apresentam maiores níveis de expressão de PD-1 do que em outras populações de células T reguladoras CD4⁺CD25^{Low} ou CD4⁺CD25^{negativo}, sendo que esta característica pode ser responsável através da interação PD-1/PD-L1 para a função supressiva de Treg. PD-L1 sobre Treg pode ligar diretamente para células T CD8⁺ melanoma antígeno-específico no qual expressam altos níveis de PD-1 sobre sua superfície (WONG *et al*, 2007). A contribuição para estas informações é através do estudo que demonstra a eficácia das

células T CD8⁺ na reação alérgica de hipersensibilidade de contato para DMBA e confirma a hipótese de que estas células protegem o hospedeiro contra o desenvolvimento de tumores, já que na ausência de células T CD4⁺ há uma regressão no desenvolvimento dos tumores induzidos (YUSUF *et al*, 2008).

A correlação de que PD-L1 é um marcador de agressividade em tumores de esôfago (OHIGASHI *et al*, 2005), pâncreas (NOMI *et al*, 2007) e fígado (GAO *et al*, 2009), foi possível observar que a estratégia de bloqueio restaura a produção de IFN- γ pelas células do infiltrado de linfomas e inibe a fosforilação da tirosina em SHP-2, mediador intracelular da sinalização via PD-1 (YAMAMOTO *et al*, 2008). *In vivo*, o bloqueio de PD-L1 promoveu a infiltração de células T CD8⁺ no estroma tumoral e aumento da expressão de IFN- γ , granzima B e perforina (WONG *et al*, 2007).

Em relação a linfócitos T infiltrados em tumores (TILs), foi encontrada expressão mais significativa de TILs em regiões PD-L1⁻ do que em regiões PD-L1⁺ de espécimes de câncer de pulmão. Nesta mesma análise constatou-se menor expressão de PD-1⁺ sobre TILs em regiões de PD-L1⁺. Estes resultados sugerem que a expressão de PD-L1 sobre células tumorais pode contribuir para regulação negativa da resposta imune contra TILs em câncer de pulmão (KONISHI *et al*, 2004). Esta mesma inibição de migração de células T CD8⁺ é também observada em regiões intraepiteliais PD-L1⁺ de câncer de cólon (LEE *et al*, 2010).

Não somente células tumorais podem expressar ligantes de PD-1 que influenciaram negativamente a resposta imune exercida por linfócitos, mas como as células tumorais as APCs associadas aos tumores podem controlar a esta resposta linfocitária (BLANK *et al*, 2005). Sendo que DCs mielóides influenciada por diversos fatores do ambiente tumoral expressam PD-L1, podendo voltar seu papel imunoestimulatório de ativação de linfócitos bloqueando especificamente PD-L1 nesta APC e desfavorecendo a interação PD-L1/PD-1 que leva inativação de linfócitos (BLUTH *et al*, 2009).

Estas terapias adjuvantes antitumorais podem ser também observadas em modelos de melanomas que foram submetidos à combinação do bloqueio de CTLA-4⁺, PD-1⁺ e PD-L1⁺, após adicional vacinação com Fvax, um fator que estimula a expansão e proliferação de células hematopoiéticas, constatou-se um maior número de células T

efetoras no microambiente tumora, diminuição de MDSCs e conversão de células T CD4⁺ naïve em Tregs (CURRAN *et al*, 2010).

O outro ligante de PD-1, a molécula PD-L2, tem papel controverso acerca da sua relação com o escape tumoral. Camundongos *knock-out* para PD-L2 desenvolvem carcinoma de forma rápida e agressiva (SHIN *et al*, 2005), porém a expressão desta molécula, em células tumorais, promove sua rápida eliminação. Interessantemente, esta sinalização antitumoral parece ser independente de PD-1. Clinicamente, os dados também são controversos a respeito de um eventual efeito co-estimulador do PD-L2. Em tumores de esôfago, a sobrevida de pacientes com alta expressão de PD-L2 foi significativamente menor do que aqueles que não expressavam esta molécula (OHIGASHI *et al*, 2005), mas em tumores de pâncreas não foi possível encontrar uma correlação entre a presença de PD-L2 e a sobrevida dos pacientes (LIU *et al*, 2003). Estes resultados em relação da habilidade de PD-L2 por estimular ou inibir a resposta de células T podem ser explicados pela existência de um segundo receptor distinto de PD-1 que pode ter uma função co-estimulatória similar de CD28 (LIU *et al*, 2003). Apesar de crescentes evidências demonstrarem o papel da via PD-1 no escape tumoral, pouco se sabe a respeito do seu significado em carcinoma espinocelular.

A carcinogênese quimicamente induzida é utilizada há muito tempo para a investigação de diversas substâncias quanto aos seus possíveis efeitos carcinogênicos ou co-carcinogênicos, principalmente, com o objetivo de reproduzir em laboratório as mesmas alterações causadas por agentes cancerígenos presentes no cotidiano (SCHANTZ *et al*, 1988; KO *et al*, 1995; HOFFMANN e DJORDJEVIC, 1997; ZNAOR *et al*, 2003). A indução química do câncer por carcinógenos químicos resulta de ligações covalentes para uma ou mais macromoléculas celulares, como o DNA, RNA e proteínas. Entre as classes de carcinógenos químicos que se ligam covalentemente as macromoléculas do tecido estão os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, nitrosaminas e aflatoxinas. Portanto, esses carcinógenos precisam ser metabolizados para uma forma reativa covalente, onde esta reação resulta num complexo de ligação com as macromoléculas celulares. Existem também exceções de carcinógenos que não precisam de ativação metabólica para seus efeitos tóxicos, como as nitrosamidas e alguns agentes alquilantes (HEIDELBERGER, 1975; DIGIOVANNI, 1992).

Dentre os métodos de indução química de carcinogênese destaca-se a aplicação de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), que se enquadra dentro da classe de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH). Eles são ligados covalentemente para proteínas e DNA da pele de camundongos. A interação covalente de PAH com as macromoléculas dos camundongos ocorre através de aplicação tópica, como resultado de uma prévia ativação metabólica (HEIDELBERGER, 1975; DIGIOVANNI, 1992).

A aplicação tópica de DMBA leva ao desenvolvimento de lesões morfológicamente e histologicamente semelhantes ao câncer em humanos (GIMENEZ-CONTI e SLAGA, 1993; CHANG *et al*, 2000; BALASENTHIL *et al*, 2003). O DMBA provoca mutações no gene HRAS promovendo uma transversão A-T no códon 61 do mesmo (JANES e WATT, 2006). Este modelo de carcinoma induzido por DMBA é estudado com maior frequência em hamsters, devido à facilidade da aplicação. Porém, com o advento da técnica de manipulação genética e desenvolvimento de animais “*knock-out*” (KO), o camundongo representa um bom modelo de estudo por permitir uma melhor compreensão das vias de sinalização envolvidas na carcinogênese.

O presente trabalho tem como objetivo principal estudar os mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune durante o desenvolvimento de carcinoma espinocelular. Especificamente, os objetivos deste estudo foram:

1- Avaliar o desenvolvimento e progressão de carcinoma induzido quimicamente através do uso do 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) no dorso de camundongos BALB/c.

2- Analisar o fenótipo das células do infiltrado inflamatório presente em lesões de carcinoma espinocelular

3. Analisar a expressão de PD-1 e seus ligantes em lesões tumorais induzidas quimicamente.

1- Animais.

Foram utilizados camundongos isogênicos Balb/c, machos, com peso variando de 18 a 20 g, provenientes do Biotério Central do Campus USP de Bauru. Os animais foram alocados, ao acaso, em gaiolas de polipropileno e mantidos em condições apropriadas, com livre acesso à água e a uma dieta padrão de laboratório. Os animais foram divididos em dois grupos:

1. **Grupo controle:** animais que não foram submetidos à indução carcinogênica;
2. **Grupo teste:** animais que foram submetidos à indução carcinogênica.

2- Carcinogênese química.

Semanalmente a região dorsal de camundongos Balb/c fêmeas foi submetida à assepsia por álcool 70% v/v e à tricotomia com auxílio de lâminas de barbear Gillette aço inox. O protocolo de indução química carcinogênica utilizada no projeto (descrito por Moore et. al 1999), compreende duas fases: iniciação, através da aplicação de dose única de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) em concentração de 25µg/100mL de acetona; e promoção, com aplicações três vezes por semanas de phorbol miristato acetato (PMA) na concentração de 4 µg /100mL de acetona, durante 15 semanas com auxílio de pipeta automática (Eppendorf Research - 100µL).

3- Eutanásia e coleta de tecidos tumorais.

Os animais foram selecionados aleatoriamente e sofreram eutanásia nos períodos de 8 e 16 semanas após o início da aplicação do DMBA. As biópsias foram coletadas e armazenadas em solução salina a 4°C e, em seguida, encaminhadas para o laboratório de Microbiologia. No laboratório, este material foi dividido em três partes: um fragmento foi criopreservado para a realização de reação de H&E e outro fragmento foi adicionado em solução enzimática para a digestão do tecido e o isolamento dos leucócitos.

4. Citocinas.

Todas as citocinas que foram utilizadas neste estudo serão proteínas recombinantes murinas (IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-10). As concentrações utilizadas foram determinadas de acordo com o procedimento a ser empregado e as especificações do fabricante.

5. Anticorpos.

Foram utilizados anticorpos conjugados a PE, FITC ou PerCP anti: CD3 (UCHT1), CD4 (RPA-T4), CD5 (UCHT2), CD8 (RPA-T8), CD14 (M5E20), CD19 (HIB19), CD25 (M-A251), CD28 (CD28.2), CD45RA (HI 100), CD45RO (UCHL1), PD-1 (MIH4), CD56 (B159), CD62L (DREG-56), CD80 (L307.4), CD83 (HB15e), CD86(FUN-1), CD122 (Mik-b2), CD152 (BNI3.1), HLA-DR (G46-6), GITR. Os respectivos isotipos controle de cabra e coelho foram utilizados. Os anticorpos para a detecção intracelular de citocinas foram anticorpos conjugados a PE ou FITC anti: IFN- γ (4S.B3), IL-10 (JES3-19F1) e TGF- β (14132).

6. Separação de leucócitos da lesão.

Para caracterização dos leucócitos presentes no tecido tumoral, biópsias do tecido foram coletadas, fragmentadas e incubadas por 1 hora a 37°C com meio RPMI contendo 500 μ g/mL de liberase. Após este procedimento, o tecido foi então processado em presença de 0,05% de DNase (Sigma) usando Medimachine (BD PharMingen), por 4 minutos, como previamente descrito (Martinez *et al*, 2005). As células foram colhidas, lavadas e a viabilidade celular determinada por exclusão do azul de tripan. Em seguida, as células foram fenotipadas por citometria de fluxo e cultivadas com brefeldina A para avaliar citocinas intracelulares.

7. Fenotipagem.

A análise fenotípica dos leucócitos das biopsias de lesões tumorais foi realizada por citometria de fluxo conforme protocolo padrão. As células foram incubadas com anticorpos bloqueadores da porção Fc de imunoglobulinas, por 45 minutos a 4°C, seguida de incubação com os anticorpos contra os determinantes específicos por mais 30 minutos a 4°C. Após este procedimento, as células foram lavadas, suspensas em PBS-formol e a leitura realizada em FACScan.

8. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para citocinas.

A presença das citocinas nos tecidos foi realizada por ELISA. A quantificação das proteínas foi realizada utilizando kits da R&D Systems (Quantikine), de acordo com as especificações do fabricante.

9. Análise estatística.

Os resultados foram expressos como mediana ou média $\pm$ desvio padrão (SD) dos resultados obtidos para cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Instat (INSTAT software, GraphPad, San Diego, CA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com indicativo de significância.

1. Desenvolvimento e progressão de carcinoma induzido quimicamente através do uso do 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) + phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) no dorso de camundongos BALB/c.

Relatos da literatura têm demonstrado que o desenvolvimento tumoral está associado a alterações fisiopatológicas (WHEELER *et al.*, 2003; VERMA *et al.*, 2006; ALLEN *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2005; IMAIDA *et al.*, 2001; NICOL *et al.*, 2004). Desta forma, avaliaram-se semanalmente eventuais alterações fisiológicas e possíveis modificações na sobrevivência de camundongos submetidos à carcinogênese química. Em relação à variação de peso dos animais, foi possível perceber oscilações de valores durante as semanas, porém não representam alterações estatisticamente significantes (Figura 1A). Durante o período das aplicações não foi observado óbito de nenhum animal decorrente das aplicações de DMBA/PMA (Figura 1B).

Semanalmente foi realizada a contagem de papilomas presentes no dorso de animais submetidos à aplicação de DMBA+PMA. Os resultados revelaram que cerca de 30% dos animais apresentaram pelo menos um papiloma após 5 semanas de indução química, sendo que após seis semanas 66% dos animais apresentaram papilomas e na 7ª semana 100% dos animais. O valor médio de papilomas observado nesse período foi de $2,33 \pm 0,7$ /papilomas por camundongos (Figura 2A). Durante as semanas subsequentes as médias do número de papilomas por camundongos aumentaram gradativamente e, após 16 semanas, constatou-se uma média de $23,17 \pm 3,4$ papilomas por camundongos (Figura 2A). O dorso dos camundongos foi avaliado macroscopicamente quanto ao desenvolvimento e comprometimento tumoral. As imagens obtidas ilustram as diferenças que foram observadas macroscopicamente em relação ao número, volume e incidência de papilomas. Animais submetidos à carcinogênese apresentaram maior número e volume de papilomas, assim como uma maior área de comprometimento tumoral, após 8ª e 16ª semanas de aplicação dos agentes carcinogênicos (Figura 2B-C).

Figura 1. Análise de sobrevivência e variação de peso de camundongos Balb/c após indução de carcinogênese química. Camundongos Balb/c receberam no dorso uma dose única de 25 μ g de DMBA e aplicação contínua de 4 μ g de PMA, três vezes por semana até a 16ª semana. Os animais foram pesados semanalmente e os dados apresentam a média do peso $\pm$ SD dos valores obtidos para cada animal. (A) O gráfico representa a taxa de sobrevivência dos animais avaliada por um período de 16 semanas de indução carcinogênica (B). Dados representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 2. Análise do desenvolvimento de papilomas em camundongos Balb/c após indução de carcinogênese química. Camundongos BALB/c receberam no dorso uma dose única de 25 μg de DMBA e aplicação contínua de 4 μg de PMA, três vezes por semana até a 16ª semana. O gráfico representa a média do número de papilomas detectados semanalmente no dorso de animais de 3 experimentos independentes (A). As setas indicam a presença de pequenos tumores na região dorsal, após 8 semanas de indução carcinogênica (B) e o aumento no número e tamanho dos tumores desenvolvidos após 16 semanas de indução carcinogênica em um animal representativo (C).

2. Análise morfológica das lesões

A análise histopatológica de tecidos coletadas do local de aplicação dos agentes carcinogênicos, após oito semanas de indução química carcinogênica, indicou a presença de infiltrado inflamatório e princípio de formação de ilhotas epiteliais no tecido conjuntivo, hiperplasia epitelial e displasia moderada (Figura 3A). Após 16 semanas de indução carcinogênica, observa-se, uma acentuada invasão do tecido conjuntivo por ilhotas epiteliais, juntamente com um considerável pleomorfismo e hiperchromatismo celular (Figura 3B).

3. Análise fenotípica do infiltrado inflamatório presente microambiente tumoral e nos linfonodos regionais de camundongos submetidos ao tratamento com DMBA + PMA.

Para determinar quantitativamente a presença de linfócitos nas lesões, leucócitos foram isolados de amostras de tumor e analisados quanto à expressão de CD3 (células T), CD19 (células B), CD4, CD8, CD14 e CLA (Figura 4). Os dados obtidos demonstraram que a maior população de leucócitos infiltrando as lesões era CD3⁺ ($55 \pm 7,7\%$). Dentro da população de linfócitos CD3⁺, a maioria das células era CD4⁺ (64%, Figura 4). Em relação às demais células encontradas nos tecidos tumorais foi detectada uma baixa percentagem de células B (CD19⁺) ($2,5 \pm 0,6\%$) e linfócitos com o marcador CLA⁺ ($4,7 \pm 1,8\%$), sendo que gradativamente observou um aumento nas células T CD8⁺ ($10,0 \pm 0,7\%$), para o marcador CD14⁺ ($23,5 \pm 9,5\%$) e linfócitos T CD4⁺ ($35,23 \pm 9,3\%$).

Depois de caracterizado o infiltrado inflamatório, avaliou-se a presença de células T expressando a molécula PD1. Os resultados revelaram que quase todas as células CD4⁺ isoladas das lesões tumorais expressavam PD1⁺ ($95 \pm 2,3\%$) (Figura 4, *insert*). A análise dos leucócitos obtidos dos linfonodos regionais de animais apresentando carcinoma revelou percentagens significativamente maiores ($p < 0,05$), de linfócitos T CD4⁺PD1⁺ ($10,7 \pm 1,1\%$) e CD8⁺PD1⁺ ($5,5 \pm 0,3\%$), quando comparado ao grupo controle (Figura 5A). Além disso, detectou-se também alta percentagem de linfócitos T CD4⁺PD-L1⁺ ($38,7 \pm 7,7\%$) ($p < 0,01$) no grupo experimental quando comparado ao grupo controle ($5,7 \pm 0,2\%$) (Figura 5B). Os leucócitos CD14⁺, isolados

dos linfonodos de animais apresentando carcinoma, expressaram alta percentagem de PD-1 ($2 \pm 0,03\%$) quando comparado aos animais do grupo controle ($0,5 \pm 0,3\%$) (Figura 5A).

Figura 3. Análise das características histológicas dos papilomas após carcinogênese química. Camundongos Balb/c receberam no dorso dose única de 25 µg de DMBA e aplicação contínua de 4 µg de PMA até a 16^a semana. Em diferentes períodos os animais foram eutanasiados e amostras do tecido tumoral foram colhidas e processadas para análise histológica. (A) Fotomicrografia do tecido tumoral de um animal controle após 8 semanas de indução química carcinogênica. Observa-se a presença de infiltrado inflamatório, ilhotas epiteliais, hiperplasia epitelial e displasia moderada. (B) Fotomicrografia do tecido tumoral de um animal controle após 16 semanas de indução química carcinogênica.

Figura 4. Caracterização do infiltrado inflamatório e expressão de PD-1 nos papilomas após carcinogênese química. Camundongos Balb/c receberam no dorso dose única de 25 μ g de DMBA e aplicação contínua de 4 μ g de PMA até a 16^a semana. Após este período, os animais foram eutanasiados e os leucócitos infiltrando as lesões foram purificados e avaliados quanto a expressão de CD3, CD4, CD8, CLA, CD14 e CD19. As células CD4⁺ foram avaliadas quanto a expressão de PD-1 (*insert*). Os dados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão da média de 3 experimentos independentes.

Figura 5. Caracterização dos leucócitos presentes nos linfonodos axiais e inguinais após carcinogênese química. Camundongos Balb/c receberam no dorso dose única de 25 µg de DMBA e aplicação contínua de 4 µg de PMA até a 16^a semana. Após este período, os animais foram eutanasiados e os leucócitos infiltrando as lesões foram purificados e avaliados quanto a percentagem de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ expressando PD-1 (A), PD-L1 (B) e PD-L2 (C). Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4. Análise do perfil de citocinas encontradas no microambiente tumoral em camundongos submetidos à indução carcinogênica após dezesseis semanas.

Baseado na literatura de que citocinas podem ter efeitos sobre a carcinogênese (SALGALLER e LODGE, 1998; DRANOFF, 2004; SMYTH *et al*, 2004; DUNN *et al*, 2006), avaliamos o perfil de citocinas em amostras de tecido tumoral de camundongos que foram induzidos quimicamente à carcinogênese com aplicação de DMBA+PMA na região dorsal. Os dados demonstraram que nas amostras coletadas de tecido tumoral dos camundongos os níveis de produção de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e IL-12, e citocinas antiinflamatórias, TGF- β e IL-10, estavam presentes no ambiente do tumor. Entretanto, os resultados não se apresentaram significantes somente para a citocina IL-10 quando comparou a produção entre o grupo tumor e grupo controle. As demais citocinas foram reguladas positivamente no grupo tumor em relação ao grupo controle ($p < 0,001$).

Figura 6. Perfil de citocinas nos tecidos tumorais após tratamento de DMBA+PMA. Amostras de tecido epitelial foram obtidas do dorso de camundongos submetidos à carcinogênese química de DMBA+PMA (coluna fechada) e de camundongos controle (colunas abertas). Os gráficos apresentam os níveis de IL-12, IL-10, TGF- β e IFN- γ detectados nos tecidos tumorais após 16 semanas decorrentes do início do tratamento. Os dados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

O processo da carcinogênese, de uma maneira geral, pode ser caracterizado por múltiplos estágios definidos em: iniciação, promoção e progressão, até sua manifestação constatada clinicamente. A iniciação corresponde ao passo inicial e irreversível no desenvolvimento do tumor, quando ocorre lesão permanente da estrutura do DNA das células. Este processo pode ser induzido quimicamente em modelos animais com a utilização de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA). Na fase de promoção, há um estímulo da proliferação celular (expansão clonal). As células que já tiveram contato com o carcinógeno (agente iniciador) quando em contato com os agentes promotores ou co-carcinógenos serão estimuladas e a velocidade do desenvolvimento da neoplasia, lenta ou rápida, ocorre em função da interação entre células iniciadas e agentes co-carcinógenos, como por exemplo, o forbol miristato acetato (PMA). O estágio seguinte é a progressão, culminando na manifestação clínica do tumor (KARIN e GRETEN, 2005, PHILIP *et al.*, 2004).

A carcinogênese quimicamente induzida em modelos experimentais é utilizada há muito tempo para a investigação de diversas substâncias e seus possíveis efeitos carcinogênicos ou co-carcinogênicos, principalmente, com o objetivo de reproduzir em laboratório as mesmas alterações causadas por agentes cancerígenos presentes no cotidiano (SCHANTZ *et al.*, 1988; KO *et al.*, 1995; HOFFMANN e DJORDJEVIC, 1997; ZNAOR *et al.*, 2003). Dentre os métodos de indução química de carcinogênese destaca-se a aplicação de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), pois este leva ao desenvolvimento de lesões morfológica e histologicamente semelhantes ao câncer em humanos (GIMENEZ-CONTI e SLAGA, 1993; CHANG *et al.*, 2000; BALASENTHIL *et al.*, 2003). Este carcinógeno químico pertence a uma classe de demais carcinógenos que se ligam covalentemente para macromoléculas como DNA, RNA e proteínas. É classificado quimicamente como hidrocarboneto aromático policíclico (PAH) que necessita de ativação metabólica dependente de oxidação pelo complexo de enzimas do citocromo P-450 para conversão na forma final do carcinógeno (HEIDELBERGER, 1975; DIGIOVANNI, 1992). Após metabolizado, o DMBA provoca mutações no gene *HRAS* promovendo uma transversoão A-T no códon 61 do mesmo (JANES e WATT, 2006), que se expressa em células tronco da camada basal da epiderme como regulador da proliferação de queratinócitos (YUSPA *et al.*, 1991; DIGIOVANNI, 1992).

A fase promotora de desenvolvimento do tumor induzido quimicamente resultante da ação de PMA vem do efeito de esta substância promover a síntese tanto de

DNA quanto de RNA, além de possuir estrutura química semelhante a do diacilglicerol (ativador natural de proteína quinase C), o que gera a ativação de vias regulatórias de crescimento celular e de resposta imunológica, além de aumentar a expressão de diversos oncogenes (YAMAZAKI *et al.*, 2009). Portanto, em resumo, considera-se a iniciação como um rápido processo irreversível que não produz nenhuma alteração morfológica na epiderme, mas em associação com agentes promotores, como o PMA, resultam em lesões pré-malignas com alterações bioquímicas e morfológicas denominadas papilomas (YUSPA *et al.*, 1991; DIGIOVANNI, 1992; GREINERT, 2009). Apesar do desenvolvimento de papilomas neste protocolo de iniciação – promoção, muitos destes irão desaparecer ou regredir, e somente uma pequena proporção progredirá para carcinoma invasivo de células escamosas (DIGIOVANNI, 1992).

Carcinomas de células escamosas ou espinocelulares são caracterizados por tecido epitelial hiperplásico e em intensa proliferação, acompanhado de células inflamatórias, informações obtidas e demonstradas na Figura 3A. Com a progressão do tumor aumenta-se o número de camadas celulares na epiderme, apresentando displasia severa, região ainda eritematosa devido ao processo inflamatório e elevada queratinização nas camadas superiores (Figura 3B) (RINKER *et al.*, 2001; LOHMANN e SOLOMON, 2001; QUAEDVLIEG *et al.*, 2006). Estes resultados são semelhantes a outros relatos na literatura, que demonstram também que o poder invasivo de carcinomas espinocelulares é ocasionado devido alterações na expressão de queratinas que controlam o processo de diferenciação terminal dos queratinócitos (YUSPA *et al.*, 1991; CHU e WEISS, 2002; MOLL *et al.*, 2008), assim como alterações na expressão de integrinas (JANES e WATT, 2006), culminando com a perda da estabilidade e integridade das células epiteliais e, perda do contato com a membrana basal que separa o tecido epitelial do tecido conjuntivo, respectivamente.

Apesar das modificações morfológicas e celulares no tecido epitelial durante o desenvolvimento tumoral estar associada a alterações fisiopatológicas (WHEELER *et al.*, 2003; VERMA *et al.*, 2006; ALLEN *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2005; IMAIDA *et al.*, 2001; NICOL *et al.*, 2004) nenhum camundongo sucumbiu após ser submetido ao processo de carcinogênese (Figura 1B), mas tiveram relativa perda de peso durante quase todo o tempo de indução com DMBA+PMA, precisamente entre 6^a à 14^a semana (Figura 1A).

De acordo com outros relatos (KIGUCHI *et al*, 1998; MOORE *et al*, 1999; OWENS *et al*, 1999) o protocolo empregado para a indução carcinogênica utilizando-se aplicação de DMBA como iniciador e repetitivas aplicações de PMA durante todo o tempo de vida dos animais resultou num crescente aumento no número de papilomas após a 5ª semana do início do tratamento (Figura 2). Os animais utilizados foram camundongos da linhagem BALB/c, sendo esse tipo de animal de pequeno porte considerado o mais adequado devido a sua maior sensibilidade a indução química quando comparado a outros animais como ratos, hamsters e coelhos (DIGIOVANNI, 1992). Em relação à linhagem, os camundongos BALB/c apresentam um padrão de resposta inflamatória caracterizada pela presença de linfócitos T CD4⁺ do subtipo Th2 e com diminuída reação de hipersensibilidade de contato (REINER e LOCKSLEY, 1995), fato não só atribuído a linhagem, mas relacionada também a um dos efeitos da utilização de PMA (KODARI *et al*, 1991). Estes fatores podem contribuir para uma fraca resposta inflamatória na região de indução que se associa ao atraso ou certa “resistência” no desenvolvimento tumoral. Esta resistência designada aos camundongos BALB/c se apresenta quando comparada com outras linhagens que são mais sensíveis aos carcinógenos químicos, observando na linhagem BALB/c menor número de papilomas e conversão para carcinomas durante o mesmo período avaliado em outras linhagens (HENNINGS *et al*, 1981; STRICKLAND *et al*, 1986; HENNINGS *et al*, 1997; WOODWORTH *et al*, 2004). Assim, este fato destaca o atraso nos resultados obtidos quanto ao número de papilomas e 100% de sobrevivência dos animais, entretanto, a metodologia empregada em camundongos BALB/c nesta pesquisa foi alcançada satisfatoriamente (Figura 2).

O processo de indução tumoral gera o recrutamento de células de defesa do hospedeiro que participam da resposta imune antitumoral (BALKWILL, 2004; UPPALURI *et al*, 2008). Sendo assim, analisando os resultados de quais células estariam em maior número no ambiente tumoral após 16 semanas de tratamento, notou-se um maior influxo de linfócitos T CD4⁺ do que linfócitos T CD8⁺, linfócitos B CD19⁺ e linfócitos T efetores com o marcador CLA, *homing* de tecido cutâneo em um contexto de pele inflamada (**Figura 4A**). Os achados deste estudo, e outros descritos na literatura (BRANTSCH *et al*, 2008), relacionam a presença de grande quantidade de linfócitos T CD4⁺ expressando a molécula PD-1⁺ (ALDERSON *et al*, 2008) a um estado crônico de estimulação destes linfócitos, levando a exaustão destas células (DONG e CHEN, 2006)

e resultando na geração de células T reguladoras (COUSSENS *et al*, 2002). Isto seria um possível mecanismo pelo qual se observou quantidades reduzidas de linfócitos T CD8⁺, envolvidos diretamente com a eliminação dos tumores (BARBER *et al*, 2006; GHEBEH *et al*, 2008). Os resultados apresentados evidenciam a expressão de PD-1 por células T CD4⁺ isoladas das lesões de camundongos submetidos à carcinogênese química (HSU *et al*, 2010; PAREKH *et al*, 2009; GHEBEH *et al*, 2008) e de acordo com outros trabalhos (WANG *et al*, 2009, CURIEL *et al*, 2008), linfócitos T CD4⁺/PD-1⁺ estão relacionados com escape tumoral e a presença destas células pode facilitar a evolução do carcinoma espinocelular também neste modelo.

A baixa detecção de linfócitos T expressando CLA⁺ é descrita por outros pesquisadores que relatam a perda do seu ligante, a E-selectina, nos vasos sanguíneos envolvidos no desenvolvimento do ambiente do carcinoma de células escamosas (FRANCESCHINI *et al*, 2009). Além disso, como demonstrado nos resultados histológicos, a perda da arquitetura tecidual no ambiente tumoral pode estar atribuída à disfunção da E-caderina, uma molécula de adesão responsável pela integridade do tecido, o que conseqüentemente levaria a ausência de linfócitos T CLA⁺ nestas localizações do tecido epitelial afetado (CLARK *et al*, 2008). Os dados obtidos evidenciaram também que percentagens significantes de células T, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺, e aquelas CD14⁺ expressavam PD-1 nos linfonodos dos animais com carcinoma espinocelular (**Figura 5A-B**), dados que correlacionam com resultados vistos em estudo anteriores, porém em região de desenvolvimento de carcinoma (KONISHI *et al*, 2004; YAMAZAKI *et al*, 2002).

A presença do elevado níveis do marcador CD3⁺, de ativação de linfócitos, obtidos nos resultados, resulta da presença de antígenos tumorais expressos em carcinomas espinocelulares que conseqüentemente eleva a produção de citocinas pró-inflamatórias (KLEIN, 1966; PARTRIDGE *et al*, 1991; STOOF *et al*, 1992; GASPARI *et al*, 1996). Neste contexto, o resultado do presente estudo observa-se a elevada produção de citocinas IL-12 e IFN- γ , que induz principalmente a constante ativação de linfócitos T CD4⁺, elevando também em contrapartida a expressão de PD-1 nestas células. Esta molécula co-estimulatória inibe a função de linfócitos após o encontro com seus ligantes (FREEMAN *et al*, 2000; BUTTE *et al*, 2007), sendo atribuído a PD-L1 como regulador do fenótipo de células Treg (FRANCISCO *et al*, 2009). Com este perfil de células, o microambiente tumoral estaria sem efetiva

contenção de células T CD8⁺, dado observado nos resultados aqui apresentados, que demonstram o número reduzido destas células em comparação de linfócitos T CD4⁺. A manutenção desfavorável para contenção do tumor, não advém somente das características das células imunossupressivas, como as células Tregs e altas produções de PD-1, mas também da elevada produção de citocinas antiinflamatórias que inibem a função da resposta imune, assim como mantém o caráter de moléculas e células imunorreguladoras (SALGALLER e LODGE, 1998; DRANOFF, 2004; SMYTH *et al*, 2004; DUNN *et al*, 2006), dados que podem ser comparados aos obtidos em relação a citocina TGF- β . Em relação a citocina IL-10 não se pode constatar resultados significantes no grupo de animais com tumor em comparação ao grupo controle, entretanto, as elevadas produções basais dos queratinócitos mostram a importância desta citocina que participa não somente na imunorregulação de pele inflamada (STADNYK, 1994; WILLIAMS e KUPPER, 1996). Outra célula que pode estar participando no desenvolvimento tumoral são os linfócitos B, que após ativados expressam altos níveis de PD-1 (AGATA *et al*, 1996; YAMAZAKI *et al*, 2002). Porém, não foi altamente detectado nos resultados deste estudo após as 16 semanas de desenvolvimento tumoral, fato que hipoteticamente pode ser devido também aos altos níveis de expressão de PD-L1 em linfócitos T CD4⁺, sugerindo a ligação de PD-1 sobre as células B com PD-L1 sobre linfócitos T CD4⁺, podendo levar a supressão de células B mediante células T.

A partir destas constatações descritas na literatura, relacionando a molécula PD-1 e de seus ligantes, PD-L1 e PD-L2, com uma maior agressividade e poder metastático em vários tipos de tumores (LEVI *et al*, 1997; TSUSHIMA *et al*, 2006; THOMPSON *et al*, 2007; HIRSHBERG *et al*, 2008; HINO *et al*, 2010), tornou-se possível utilizar essa molécula através de seu bloqueio ou neutralização como uma das estratégias de contenção do desenvolvimento tumoral (WALDMANN, 2006). Deste modo, relatos na literatura demonstraram que o bloqueio da molécula PD-1 resulta em uma maior efetividade de resposta das células T em melanomas, assim como restauração de linfócitos T CD8⁺ efetores tumor-específicos (WONG *et al*, 2007).

De acordo com os resultados obtidos, ficou evidente que, apesar de um aumento nas células inflamatórias isoladas de lesões de carcinoma espinocelular, a possibilidade de uma percentagem relevante delas não estar agindo no seu potencial máximo é alta. Porém, para se entender o real significado da molécula PD-1 no desenvolvimento de tumores requer mais estudos.

1. O infiltrado inflamatório isolado de amostras de carcinoma espinocelular é composto principalmente de linfócitos T.
2. PD-1 é expresso em altos níveis por células T isoladas do microambiente tumoral.
3. A expressão de PD-L1 é intensa em células T CD4⁺ em carcinoma espinocelular.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., Honjo, T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 8(5): 765-772, 1996.
- Algarra, I., Cabrera, T., Garrido, F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol.* 61: 65-73, 2000.
- Alderson, K.L., Zhou, Q., Berner, V., Wilkins, D.E., Weiss, J.M., Blazar, B.R., Welniak, L.A., Wiltout, R.H.; Redelman, D., Murphy, W.J. Regulatory and conventional CD4⁺ T cells show differential effects correlating with PD-1 and B7-H1 expression after immunotherapy. *J Immunol.* 180(5): 2981-2988, 2008.
- Allen, S.M., Florell, S.R., Hanks, A.N., Alexander, A., Diedrich, M.J., Altieri, D.C., Grossman, D. Survivin expression in mouse skin prevents papilloma regression and promotes chemical-induced tumor progression. *Cancer Res.* 63(3): 567-572, 2003.
- Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.D. Interleukin-10 therapy - review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 55(2): 241-269, 2003.
- Balasenthil, S., Rao, K.S., Nagini, S. Altered cytokeratin expression during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by S-allylcysteine. *Polish J Pharmacol.* 55: 793-798, 2003.
- Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 4: 540-550, 2004.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Ahmed, R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 439(7077): 682-687, 2006.
- Bartikova, J., et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature.* 434: 864-870, 2005.
- Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow, L., Blohme, I., *et al.* Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer.* 60: 183-189, 1995.

- Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., et al. Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 10: 29-37, 2009.
- Blank, C., Gajewski, T.F., Mackensen, A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 54(4): 307-314, 2005.
- Blank, C., Mackensen, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother.* 56: 739-745, 2007.
- Bluth, M.J., Zaba, L.C., Moussai, D., Suárez-Fariñas, M., Kaporis, H., Fan, L., Pierson, K.C., White, T.R., Pitts-Kiefer, A., Fuentes-Duculan, J., Guttman-Yassky, E., Krueger, J.G., Lowes, M.A., Carucci, J.A. Myeloid dendritic cells from human cutaneous squamous cell carcinoma are poor stimulators of T-cell proliferation. *Journal of Investigative Dermatology.* 129: 2451-2462, 2009.
- Brantsch, K.D., Meisner, C., Schönfisch, B., Trilling, B., Wehner-Caroli, J., Röcken, M., Breuninger, H. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol.* 9(8): 713-720, 2008.
- Bsoul, S.A., Huber, M.A., Terezhalmay, G.T. 2005. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. *J Contemp Dent Pract.* 6(4): 1-16, 2005.
- Bui, J.D., Schreiber, R.D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Current Opinion in Immunology.* 19: 203-208, 2007.
- Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 13: 1-27, 1970.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., Freeman, G.J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 27: 111-122, 2007.

- Carter, L., Fouser, L.A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C.R., et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 32(3): 634-643, 2002.
- Chang, K.W., Sarraj, S., Lin, S.C., Tsai, P.I., Solt, D. p53 expression, p53 and Ha-ras mutation and telomerase activation during nitrosamine-mediated hamster pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 21: 1441-1451, 2000.
- Chu, P.G., Weiss, L.M. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 40: 403-439, 2002.
- Clark, R.A., Huang, S.J., Murphy, G.F., Mollet, I.G., Hijnen, D., Muthukuru, M., Schanbacher, C.F., Edwards, V., Miller, M.D.M., Kim, J.E., Lambert, J., Kupper, T.S. Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells. *J Exp Med.* 205(10): 2221-2234, 2008.
- Coussens, L.M., Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 420: 860-867, 2002.
- Curiel, T.J. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol.* 20(2): 241-246, 2008.
- Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H., Allison, J.P. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(9): 4275-4280, 2010.
- Das, R.K., Hossain, S.K., Bhattacharya, S. Diphenylmethyl selenocyanate inhibits DMBA-croton oil induced two-stage mouse skin carcinogenesis by inducing apoptosis and inhibiting cutaneous cell proliferation. *Cancer Lett.* 230(1): 90-101, 2005.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 443, 350-354, 2006.
- DiGiovanni, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. 54: 63-128, 1992.

- Dong, H., Chen, X. Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses. *Cell Mol Immunol.* 3: 179–187, 2006.
- Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 4: 11-22, 2004.
- Driessens, G., Kline, J., Gajewski, T.F. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunological Reviews.* 229: 126-144, 2009.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 3(11): 991-998, 2002.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., Schreiber, R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 6: 836-848, 2006.
- Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 22: 329-360, 2004.
- Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D. The immunobiology of Cancer immunosurveillance and immunoediting. 21: 137-148, 2004.
- Engel, A.M., Svane, I.M., Rygaard, J., Wederlin, O. MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *J Immunol.* 45: 463-470, 1997.
- Euvrard, S., Kanitakis, J., Claudy, A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med.* 348: 1681, 2003.
- Franceschini, D., Paroli, M., Francavilla, V., Videtta, M., Morrone, S., Labbadia, G., Cerino, A., Mondelli, M.U., Barnaba, V. PD-L1 negatively regulates CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest.* 119: 551–564, 2009.
- Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., Sharpe, A.H. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 206: 3015-3029, 2009.

- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 192(7): 1027-1034, 2000.
- Fuller, M.J., Hildeman, D.A., Sabbaj, S., Gaddis, D.E., Tebo, A.E., Shang, L., Goepfert, P.A., Zajac, A.J. Cutting edge: emergence of CD127^{high} functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help. *J Immunol.* 174: 5926-5930, 2005.
- Fuller, M.J., Khanolkar, A., Tebo, A.E., Zajac, A.J. Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections. *J Immunol.* 172: 4204-4214, 2004.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 313: 1960-1964, 2006.
- Gao, Q., Wang, X-Y., Qiu, S-J., Yamato, I., Sho, M., Nakajima, Y., Zhou, J., Li, B-Z., Shi, Y-H., Xiao, Y-S., Xu, Y., Fan, J. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 15(3): 971-979, 2009.
- Gaspari, A.A., Sempowski, G.D., Chess, P., Gish, J., Phipps, R.P. Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 and co-stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur J Immunol.* 26: 1371-1377, 1996.
- Ghebeh, H., Barhoush, E., Tulbah, A., Elkum, N., Al-Tweigeri, T., Dermime, S. FOXP3⁺ Tregs and B7-H1⁺/PD-1⁺ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC Cancer.* 23: 8:57, 2008.
- Gimenez-Conti, I.B., Slaga, T.J. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J Cell Biochem.* 17: 83-90, 1993.

- Girardi, M., Glusac, E., Filler, R.B., Roberts, S.J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R.E., Hayday, A.C. The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR) $\gamma\delta^+$ and TCR $\alpha\beta^+$ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J Exp Med.* 198: 747-755, 2003.
- Golden-Mason, L., Palmer, B.E., Kassam, N., Towshend-Bulson, L., Livingston, S., McMahon, B.J., Castelblanco, N., Kuchroo, V., Gretch, D.R., Rosen, H.R. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Virol.* 83: 9122-9130, 2009.
- Gorgoulis, V.G., *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 434: 907-913, 2005.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 23: 515-548, 2005.
- Greinert, R. Skin cancer: new markers for better prevention. *Pathobiology.* 76: 64-81, 2009.
- Ha, S-J., Mueller, S.N., Wherry, E.J., Barber, D.L., Aubert, R.D., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Ahmed, R. Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection. *J Exp Med.* 205(3): 543-555, 2008.
- Haspot, F., Fehr, T., Gibbons, C., Zhao, G., Hogan, T., Honjo, T., Freeman, G.J., Sykes, M. Peripheral deletional tolerance of alloreactive CD8 but not CD4 T cells is dependent on the PD-1/PD-L1 pathway. *Blood.* 112: 2149-2155, 2008.
- Heidelberger, C. Chemical carcinogenesis. *Annu Rev Biochem.* 44: 79-121, 1975.
- Hennings, H., Devor, D., Wenk, M.L., Slaga, T.J., Former, B., Colburn, N.H., Bowden, G.T., Elgjo, K., Yuspa, S.H. Comparison of two-stage epidermal carcinogenesis initiated by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene or *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in newborn and adult SENCAR and BALB/c mice. *Cancer Res.* 41: 773-779, 1981.

- Hennings, H., Lowry, D.T., Yuspa, S.H., Mock, B., Potter, M. New strains of inbred SENCAR mice with increased susceptibility to induction of papillomas and squamous cell carcinomas in skin. *Molecular Carcinogenesis*. 20: 143-150, 1997.
- Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Honjo, T., Okazaki, T., Tokura, Y. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 116: 1757-1766, 2010.
- Hirshberg, A., Shnaiderman-Shapiro, A., Kaplan, I., Berger, R. Metastatic tumours to the oral cavity - pathogenesis and analysis of 673 cases. *Oral Oncology*. 44: 743-752, 2008.
- Hoffmann, D., Djordjevic, M.V. Chemical composition and carcinogenicity of smokeless tobacco. *Adv Dent Res*. 11(3): 322-329, 1997.
- Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., Stephen, C.J. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 5: 772-782, 2006.
- Hsu, M.C., Hsiao, J.R., Chang, K.C., Wu, Y.H., Su, I.J., Jin, Y.T., Chang Y. Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. *Mod Pathol*. 2010.
- Imaida, K., Kuzutani, K., Wang, J., Fujiwara, O., Ogiso, T., Kato, K., Shirai, T. Lack of promotion of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated mouse skin carcinogenesis by 1.5 GHz electromagnetic near fields. *Carcinogenesis*. 22(11): 1837-1841, 2001.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J*. Nov;11(11): 3887-3895, 1992.
- Janes, S. M., Watt, F. M. New roles for integrins in squamous cell carcinoma. *Nature Reviews*. 6: 175-183, 2006.

- Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D.M., Hofhuis, F.M., Boackle, S.A., Takahashi, K., Holers, V.M., Walport, M., Gerard, C., Ezekowitz, A., Carroll, M.C., Brenner, M., Weissleder, R., Verbeek, J.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., Mathis, D. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16: 157, 2002.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., *et al.* Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 7556-7561, 1998.
- Karin, M., Greten, F.R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Immunol.* 5: 749-759, 2005.
- Kaufmann, D.E., Kavanagh, D.G., Pereyra, F., *et al.* Upregulation of CLTA-4 by HIV-specific CD4⁺ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol.* 8: 1246-1254, 2007.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 26: 677-704, 2008.
- Khong, H.T., Restifo, N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 3(11): 999-1005, 2002.
- Kiguchi, K., Beltrán, L., Rupp, T., DiGiovanni, J. Altered expression of epidermal growth factor receptor ligands in tumor promoter-treated mouse epidermis and in primary mouse skin tumors induced by an initiation-promotion protocol. *Molecular Carcinogenesis.* 22: 73-83, 1998.
- Kim, D.J., Chan, K.S., Sano, S., DiGiovanni, J. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Mol Carcinogenesis.* 46: 725-731, 2007.
- Kim, P.S., Ahmed, R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Current Opinion in Immunology.* 22: 1-8, 2010.
- Klein, G. Tumor antigens. *Annu Ver Microbiol.* 20: 223-252, 1966.

- Ko, Y.C., Huang, Y.L., Lee, C.H., Chen, M.J., Lin, L.M., Tsai, C.C. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med.* 24(10): 450-453, 1995.
- Kodari, E., Pavone, A., Reiners, J.J.Jr. Local- and systemic-mediated suppression of contact hypersensitivity in mice by several structurally unrelated classes of tumor promoters. *Carcinogenesis.* 12: 1933-1937, 1991.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., Schreiber, R.D. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 450(6): 903-908, 2007.
- Konishi, J., Yamazaki, K., Azuma, M., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Nishimura, M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res.* 10: 5094-5100, 2004.
- Korganow, A.S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J.L., Benoist, C., Mathis, D. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity.* 10: 451, 1999.
- Kyewski, B., Klein, L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 24: 571-606, 2006.
- Lee, H., Kim, J.H., Yang, S.Y., Kong, J., Oh, M., Jeong, D.H., Chung, J-I., Bae, K.B., Shin, J.Y., Hong, K.H., Choi, I. Peripheral blood gene expression of B7 and CD28 family members associated with tumor progression and microscopic lymphovascular invasion in colon cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010.
- Levi, F., Randimbison, L., La Vecchia, C., Erler, G., Te, V-C. Incidence of invasive cancers following squamous cell skin cancer. *American Journal of Epidemiology.* 146(9): 734-739, 1997.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta regulation of immune response. *Annu Rev Immunol.* 24: 99-146, 2006.

- Liu, X., Gao, J.X., Wen, J., Yin, L., Li, O., Zuo, T., et al. B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *J Exp Med*. 197(12): 1721-1730, 2003.
- Lohmann, C.M., Solomon, A.R. Clinicopathologic variants of cutaneous squamous cell carcinoma. *Advances in Anatomic Pathology*. 8(1): 27-36, 2001.
- Loke, P., Allison, J.P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(9): 5336-5341, 2003.
- Lowe, S.W., Cepero, E., Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432: 307-315, 2004.
- Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*. 74: 181-273, 2000.
- Martinez, A., Brethauer, U., Rojas, I.G., Spencer, M., Mucientes, F., Borlando, J., et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med*. 34(5): 257-262, 2005.
- Medema, J.P., et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 11515-11520, 2001.
- Mocellin, S., Nitti, D. Therapeutics targeting tumor immune escape: towards the development of new generation anticancer vaccines. *Medicals Res Reviews*. 28(3): 413-444, 2008.
- Moll, R., Divo, M., Langbein, L. The human keratins. biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 129: 705-733, 2008.
- Moore, R.J., Owens, D.M., Stamp, G., Arnott, C., Burke, F., East, N., Holdsworth, H., Turner, L., Rollins, B., Pasparakis, M., Kollias, G., Balkwill, F. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med*. 5(7): 828-831, 1999.

- Nicol, C.J., Yoon, M., Ward, J.M., Yamashita, M., Fukamachi, K., Peters, J.M., Gonzalez, F.J. PPARgamma influences susceptibility to DMBA-induced mammary, ovarian and skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 25(9): 1747-1755, 2004.
- Nielsen, C., Hansen, D., Husby, S., Jacobsen, B.B., Lillevang, S.T. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. 62(6): 492-497, 2003.
- Nishimura, H., Honjo, T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends in Immunology*. 22(5): 265-268, 2001.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 11(2): 141-151, 1999.
- Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 291(5502): 319-322, 2001.
- Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., Hamada, K., Kubo, A., Kanehiro, H., Nakamura, S., Enomoto, K., Yagita, H., Azuma, M., Nakajima, Y. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Cancer*. 13(7): 2151-2157, 2007.
- Ohigashi, Y., Sho, M., Yamada, Y., Tsurui, Y., Hamada, K., Ikeda, N., Mizuno, T., Yoriki, R., Kashizuka, H., Yane, K., Tsushima, F., Otsuki, N., Yagita, H., Azuma, M., Nakajima, Y. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 11(8): 2947-2953, 2005.
- Okazaki, T., Honjo, T. The PD-1 - PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in Immunology*. 27(4): 195-201, 2006.
- Okazaki, T., Tanaka, Y., Nishio, R., Mitsuiye, T., Mizoguchi, A., Wang, J., et al. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med*. 9(12): 1477-1483, 2003.

- Owens, D.M., Wei, S-J.C., Smart, R.C. A multihit, multistage model of chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 20(9): 1837-1844, 1999.
- Parekh, V.V., Lalani, S., Kim, S., Halder, R., Azuma, M., Yagita, H., Kumar, V., Wu, L., Kaer, L.V. PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J Immunol*. 182(5): 2816-2826, 2009.
- Partridge, M., Chantry, D., Turner, M., Feldmann, M. Production of interleukin-1 and interleukin-6 by human keratinocytes and squamous cell carcinoma cell lines. *The Journal of Investigative Dermatology*. 6(5): 771-776, 1991.
- Philip, M., Rowley, D.A., Schreiber, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology*. 14: 433-439, 2004.
- Quaadvlieg, P.J.F., Creytens, D.H.K.V., Epping, G.G., Peutz-Kootstra, C.J., Nieman, F.H.M., Thissen, M.R.T.M., Krekels, G.A. Histopathological characteristics of metastasizing squamous cell carcinoma of the skin and lips. *Histopathology*. 49: 256-264, 2006.
- Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., Sotomayor, E.M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 25: 267-296, 2007.
- Reiner, S.L., Locksley, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*. 13: 151-177, 1995.
- Richter, K., Agnellini, P., Oxenius, A. On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int Immunol*. 22: 13-23, 2010.
- Riley, J.L. PD-1 signaling in primary T cells. 229: 114-125, 2009.
- Rinker, M.H., Fenske, N.A., Scalf, L.A., Glass, L.F. Histologic variants of squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Control*. 8(4): 354-363, 2001.
- Salgaller, M.L., Lodge, P.A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 68: 122-138, 1998.

- Schantz, S.P., Byers, R.M., Goepfert, H., Shallenberger, R.C., Beddingfield, N. The implication of tobacco use in the young adult with head and neck cancer. *Cancer*. 62(7): 1374-1380, 1988.
- Schreiber, R.D. Cancer vaccines 2004 opening address: the molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Cancer Immun.* 5(1): 1-12, 2005.
- Schumacher, K., Haensch, W., Roefzaad, C., Schlag, P.M. Prognostic significance of activated CD8⁺ T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 61: 3932-3936, 2001.
- Seliger, B., Marincola, F.M., Ferrone, S., Abken, H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends in Molecular Medicine*. 14(12): 550-559, 2008.
- Shacter, E., Weitzman, S.A. Chronic inflammation and cancer. *Oncology*. 16: 217, 2002.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., *et al.* IFN- γ lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 410: 1107-1111, 2001.
- Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R., Freeman, G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*. 8(3): 239-245, 2007.
- Shin, T., Yoshimura, K., Shin, T., Crafton, E.B., Tsuchiya, H., Housseau, F., *et al.* In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 201(10): 1531-1541, 2005.
- Skala, M.C., Squirrell, J.M., Vrotsos, K.M., Eickhoff, J.C., Gendron-Fitzpatrick, A., Eliceiri, K.W., Ramanujam, N. Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues. *Cancer Res.* 65(4): 1180-1186, 2005.
- Smyth, M.J., Cretney, E., Kershaw, M.H., Hayakawa, Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological Reviews*. 202: 275-293, 2004.

- Smyth, M.J., Crowe, N.Y., Godfrey, D.I. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol.* 13: 459-463, 2001.
- So, T., et al. Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer Res.* 65: 5945-5952, 2005.
- Stadnyk, A.W. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* 8: 1041-1047, 1994.
- Stewart, C.A., Trinchieri, G. Reinforcing suppression using regulators: a new link between Stat3, IL-23, and Tregs in tumor immunosuppression. *Cancer Cell.* 15: 81-83, 2009.
- Stoof, T.J., Mitra, R.S., Sarma, V., Dixit, V.M., Nickoloff, B.J. Keratinocyte activation following T-lymphocyte binding. *The Journal of Investigative Dermatology.* 98(1): 92-95, 1992.
- Street, S.E., Cretney, E., Smyth, M.J. Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 97: 192-197, 2001.
- Street, S.E., Trapani, J.A., MacGregor, D., Smyth, M.J. Supression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon γ . *J Exp Med.* 196: 129-134, 2002.
- Strickland, J.E., Allen, P.T., Sauder, D.N., Kawamura, H., Fong, M.C., Yuspa, S.H. In vitro comparisons of SENCAR and Balb/c primary epidermal cells. *Environmental Health Perspectives.* 68: 39-44, 1986.
- Swann, J.B., Vesely, M.D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R.D. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 105(2): 652-656, 2008.
- Thompson, R.H., Dong, H., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Cheville, J.C., Kwon, E.D. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 13(6): 1757-1761, 2007.
- Timar, J., Csuka, O., Remenar, E., Repassy, G., Kasler, M. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 24(1): 107-127, 2005.

- Tsushima, F., Tanaka, K., Otsuki, N., Youngnak, P., Iwai, H., Omura, K., Azuma, M. Predominant expression of B7-H1 and its immunoregulatory roles in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 42: 265-274, 2006.
- Uppaluri, R., Dunn, G.P., Lewis Jr., J.S. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immunity*. 8: 1-10, 2008.
- Verma, A.K., Wheeler, D.L., Aziz, M.H., Manoharan, H. Protein kinase Cepsilon and development of squamous cell carcinoma, the non melanoma human skin cancer. *Mol Carcinog*. 45(6): 381-388, 2006.
- Vicari, A.P., Chiodoni, C., Vaure, C., Ait-Yahia, S., Dercamp, C., Matsos, F., Reynard, O., Taverne, C., Merle, P., Colombo, M.P. Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J Exp Med*. 196: 541-549, 2002.
- Vissers, K.E., Coussens, L.M. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. *Cancer Immunol Immunother*. 54: 1143-1152, 2005.
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., *et al*. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 348: 203-213, 2003.
- Znaor, A., Brennan, P., Gajalakshmi, V., Mathew, A., Shanta, V., Varghese, C., Boffetta, P. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer*. 105(5): 681-686, 2003.
- Zitvogel, L., Tesniere, A., Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Rev Immunol*. 6: 715-727, 2006.
- Waldmann, T.A. Effective cancer therapy through immunomodulation. *Annu Rev Med*. 57: 65-81, 2006.

- Wang, W., Lau, R., Yu, D., Zhu, W., Korman, A., Weber, J. PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4⁺CD25^{Hi} regulatory T cells. *International Immunology*. 21(9): 1065-1077, 2009.
- Wheeler, D.L., Ness, K.J., Oberley, T.D., Verma, A.K. Protein kinase C-epsilon is linked to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor-alpha ectodomain shedding and the development of metastatic squamous cell carcinoma in protein kinase C-epsilon transgenic mice. *Cancer Res.* 63(19): 6547-6555, 2003.
- Williams, I.R., Kupper, T. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sciences*. 58(18): 1485-1507, 1996.
- Wong, R.M., Scotland, R.R., Lau, R.L., Wang, C., Korman, A.J., Kast, W.M., Weber, J.S. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int Immunol*. 19(10): 1223-1234, 2007.
- Woodworth, C.D., Michael, E., Smith, L., Vijayachandra, K., Glick, A., Hennings, H., Yuspa, S.H. Strain-dependent differences in malignant conversion of mouse skin tumors is an inherent property of the epidermal keratinocyte. *Carcinogenesis*. 25(9): 1771-1778, 2004.
- Yamamoto, R., Nishikori, M., Kitawaki, T., Sakai, T., Hishizawa, M., Tashima, M., et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 111(6): 3220-3224, 2008.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., Azuma, M., Yagita, H. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol*. 169(10): 5538-5545, 2002.
- Yamazaki, T., Takahashi, A., Pan, J., Yamaguchi, N., Yokoyama, K.K. Phosphorylation of Activation Transcription Factor-2 at Serine 121 by Protein Kinase C Controls c-Jun-mediated Activation of Transcription. *J Biol Chem*. 284(13): 8567-8581, 2009.

- Yi, J.S., Cox, M.A., Zajac, A.J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 129: 474-481, 2010.
- Yuspa, S.H., Kilkenny, A., Cheng, C., Roop, D., Hennings, H., Kruszewski, F., Lee, E., Strickland, J., Greenhalgh, D.A. Alterations in epidermal biochemistry as a consequence of stage-specific genetic changes in skin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*. 93: 3-10, 1991.
- Yusuf, N., Nasti, T.H., Katiyar, S.K., Jacobs, M.K., Seibert, M.D., Ginsburg, A.C., Timares, L., Xu, H., Elmets, C.A. Antagonistic roles of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in 7,12-dimethylbenz(*a*)anthracene cutaneous carcinogenesis. *Cancer Res*. 68(10): 3924-3930, 2008.